

Jaspamide: Identifikasi struktur senyawa sitotoksik dan fungisid dari spons *Stylissa flabelliformis*

Jaspamide: Structure identification of cytotoxic and fungicide compound isolated from *Stylissa flabelliformis* sponges

Erna Prawita Setyowati, Sudarsono dan Subagus Wahyuono

Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Telah dilakukan penelitian identifikasi struktur senyawa sitotoksik dan fungisid dari spons *Stylissa flabelliformis*. Identifikasi senyawa aktif dilakukan menggunakan spektroskopi UV, MS, ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR.

Hasil penentuan struktur berdasarkan spektra ultraviolet tampak, massa, proton dan karbon NMR serta penelusuran pustaka disimpulkan bahwa senyawa aktif sitotoksik dan fungisid dari spons *Stylissa flabelliformis* adalah jaspamide.

Kata kunci: spons, *Stylissa flabelliformis*, jaspamide, elucidasi struktur

Abstract

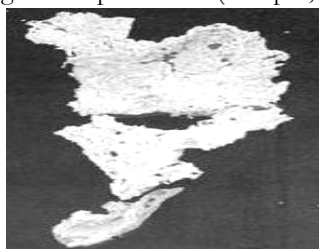
A research on the structure identification of cytotoxic and fungicide compound of *Stylissa flabelliformis* sponge has been conducted. The structure identification was analysed with spectroscopy ultraviolet, MS, ^1H -NMR and ^{13}C -NMR methods.

Based on the spectroscopic data and comparison with literatures, the compound was identified as jaspamide.

Key words: sponge, *Stylissa flabelliformis*, jaspamide, structure elucidation

Pendahuluan

Spons termasuk organisme multiseluler dan merupakan invertebrata laut dengan tingkat paling rendah. Sebagian besar spons hidup di laut (80%), sedangkan sisanya hidup di air tawar. Spons dapat ditemukan di semua daerah kawasan laut dari katulistiwa sampai kutub, di laut dangkal maupun dalam (Hooper, 1997)



Gambar 1. Spons *Stylissa flabelliformis* (Hooper dan Soest, 2002).

Spons *Stylissa flabelliformis* (Gambar 1) berwarna merah dengan bentuk tipis dan lunak, permukaan berpori dengan tonjolan tak beraturan pada seluruh tubuh, bagian dalam tubuh berwarna putih kekuningan. Klasifikasi spons ini adalah sebagai berikut: Kerajaan Animalia, Divisi Porifera, Kelas Demospongiae, Anak Kelas Ceractinomorpha, Bangsa Halicondrida, Suku Axenellida, Marga Stylissa dengan nama Jenis *Stylissa flabelliformis* (Hooper and Soest, 2002).

Hasil penelitian sebelumnya (Setyowati *et al.*, 2003, 2004) menunjukkan adanya senyawa sitotoksik dan fungisid dalam spons *Stylissa flabelliformis*. Potensi sitotoksik dan fungisid tersebut cukup besar, yaitu untuk uji sitotoksik terhadap sel mieloma *in vitro* sebesar $\text{LC}_{50} = 0,08$ $\mu\text{g}/\text{ml}$, sedangkan uji fungisid terhadap *Candida*

albicans sampai dengan konsentrasi 10mg/ml menghasilkan hambatan pertumbuhan yang setara dengan 11,13mg/ml miconazole nitrat. Berdasarkan atas data tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi struktur senyawa aktif tersebut.

Metodologi

Bahan

Spons *Stylissa flabelliformis* diambil dari perairan P. Bali.

Alat

Spektrofotometer Inframerah HITACHI FT-R-1900, spektrometer Massa EIMS dari INCOS 50 (Finigan MAT). Spektrometer NMR VXR 300 (varian) frekuensi pengukuran 500 MHz (^1H -NMR) dan 125 MHz (^{13}C -NMR).

Isolasi senyawa aktif

Isolasi senyawa aktif didapat dari penelitian Setyowati (2003 dan 2004) dengan cara spons dimaserasi menggunakan kloroform. Ekstrak kloroform difraksinasi menggunakan pelarut heksana dan etil asetat dalam berbagai konsentrasi. Terhadap fraksi aktif dilakukan kromatografi preparatif dan pemurnian hingga diperoleh senyawa murni. Setiap langkah isolasi dimonitor dengan uji toksik secara BST (*Brine Shrimp Lethality Test*). Terhadap senyawa murni toksik (senyawa aktif) dilakukan uji *cell line* dan antimikroba.

Data spektroskopi

Data spektrum spektroskopi senyawa aktif diperoleh dari Prof.Dr. Peter Proksch (Universitas Duesseldorf, Jerman).

Analisis data

Identifikasi struktur senyawa aktif dilakukan dengan interpretasi data spektrum spektroskopi UV,

MS (berat molekul), ^1H -NMR (pergeseran kimia (δ) dan tetapan kopling), ^{13}C -NMR (pergeseran kimia) dan perbandingan data spektrum dari pustaka.

Hasil Dan Pembahasan

Spektrum Ultraviolet (UV) dalam (MeOH)

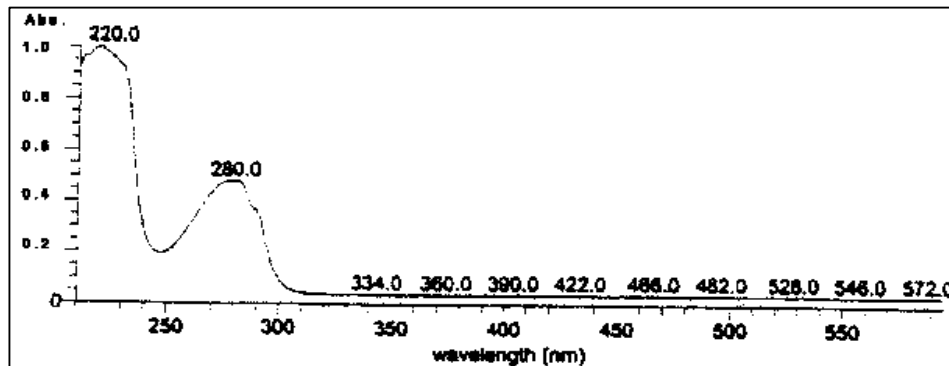
Serapan maksimal pada panjang gelombang λ_{280} dan $\lambda_{220\text{nm}}$ (MeOH) diinterpretasikan sebagai inti aromatik dalam senyawa aktif dan secara spesifik sebagai inti stirena atau inti benzen dengan auksokrom. Adanya *shoulder* pada puncak $\lambda_{280\text{nm}}$ (Gambar 2) menunjukkan adanya $-\text{C}=\text{O}$ (Silverstein *et al.*, 1991).

Spektrum infra merah (IR) dalam KBr pellet

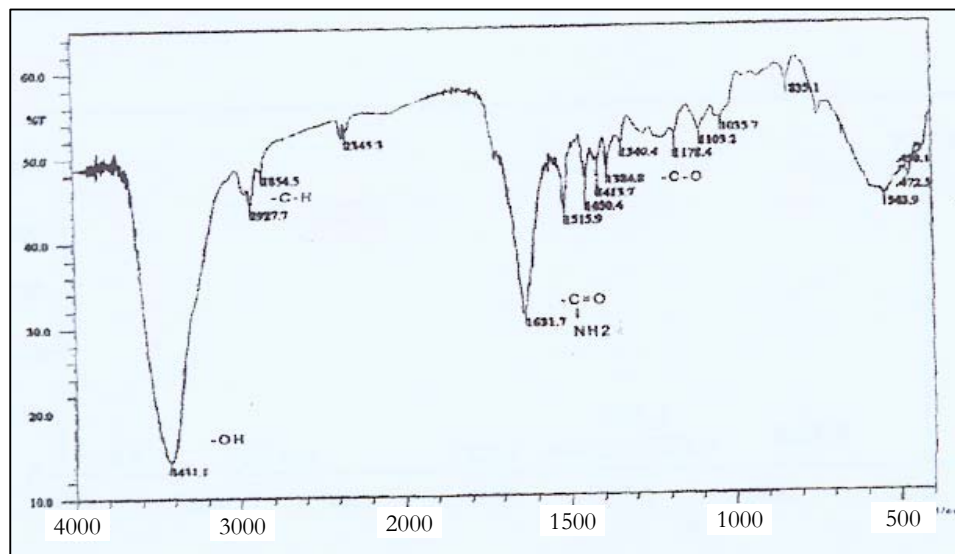
Dari data spektrum IR (KBr) terlihat adanya gugus $-\text{OH}$ pada senyawa aktif yang ditunjukkan oleh pita serapan pada bilangan gelombang : $3341,1\text{ cm}^{-1}$ (Gambar 3). Pita serapan pada $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan $-\text{OH}$ dan NH_2 . Serapan pada $1631,7\text{ cm}^{-1}$ merupakan serapan karakteristik dari gugus karbonil ($-\text{C}=\text{O}$) dari suatu ikatan amida, sehingga senyawa aktif mengandung gugus $-\text{OH}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{HN}-\text{C}=\text{O}$ (alifatik amida) (Silverstein *et al.*, 1991).

Spektrum massa (MS)

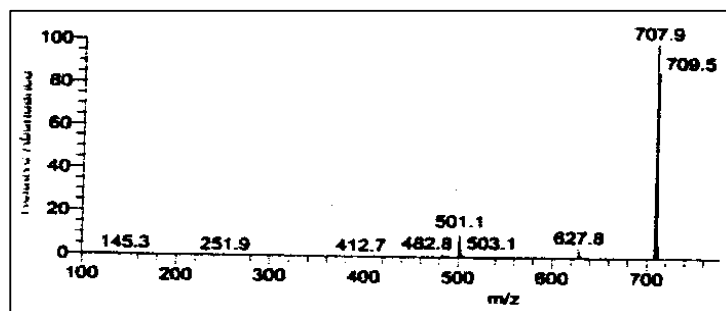
Spektrum massa senyawa aktif (Gambar 4) terdiri dari puncak-puncak pada m/z 707,9(100%); 709,5(85%); 627,6(5%); 503,1(7%); 501,1(10%); 482,6(1%); 412,7(1%); 251,9(1%) dan 145,3(1%). Puncak pada m/z 709,5 diduga sebagai puncak ion molekul yang menunjukkan berat molekul dari senyawa aktif. Berdasarkan *isotop law* disimpulkan adanya atom Br dalam senyawa tersebut ($[\text{M}^+]$ pada



Gambar 2. Spektrum UV senyawa aktif dalam MeOH



Gambar 3. Spektrum IR senyawa aktif



Gambar 4. Spektrum massa senyawa aktif

m/z 707,9). Atom Brom mempunyai berat molekul sebesar 79 unit massa dengan isotop 81 unit dan kelimpahan relative di alam sebesar 50,69% dan 49,31%. Hal ini memberi indikasi tentang keberadaan Br dalam senyawa yang juga didukung oleh puncak m/z 707,9 dan 709,5 yang mempunyai relative intensitas hampir sama.

Menurut aturan hidrogen, bobot senyawa ganjil menunjukkan adanya atom -N yang berjumlah ganjil. Namun adanya tambahan satu atom Br, maka molekul mempunyai bobot molekul ganjil (79) dengan jumlah atom N genap seperti pada molekul senyawa aktif.

Spektrum ^{13}C -NMR dalam DMSO- d_6

Spektrum ^{13}C -NMR senyawa aktif menunjukkan adanya 34 karbon dalam struktur

senyawa aktif (Gambar 5), diantaranya 4 atom karbonil yang *downfield* terletak pada λ 173,99; 172,19 ; 170,03 dan 168,63 ppm. Kompleksitas puncak di tingkat upfield dapat dianalisis dengan teknik DEPT (*Distortionless Enhancement through Polarization Transfer*) (Gambar 6), sehingga jumlah -CH₃, -CH₂, -CH dan karbon kuartener dapat ditentukan. Dari data spektrum DEPT diketahui tipe karbon yaitu 6 karbon -CH₃, 4 karbon -CH₂ dan 14 karbon -CH. Dari pengurangan jumlah karbon dari data ^{13}C -NMR dan ^{13}C -NMR DEPT tehnik dapat diketahui jumlah karbon kuartener adalah 10. Hasil lengkap data spektrum ^{13}C -NMR terlihat pada Tabel I.

Konfirmasi data pada Tabel I dilakukan dengan spektrum NMR 2 dimensi yaitu dengan HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) yang digunakan untuk menghubungkan-

Tabel I. Pergeseran kimia ^{13}C -NMR dari senyawa aktif (125 MHz) dalam DMSO-d_6 dan tipe karbon

No. karbon (C) senyawa aktif	δ (ppm) senyawa aktif	Keterangan Tipe karbon
08	173,99	C
06	172,19	C
01	170,03	C
04	168,63	C
19	156,24	C
27	136,07	C
11	131,95	C
08	131,58	C
12	129,19	CH
17	127,22	CH
22	127,04	C
25	121,35	CH
24	118,89	CH
23	118,32	CH
18	114,92	CH
26	110,47	CH
21	109,49	C
28	109,12	C
15	69,54	CH
05	54,32	CH
03	48,53	CH
07	44,28	CH
14	42,42	CH_2
10	41,92	CH_2
02	40,70	CH_2
09	37,84	CH
34	30,46	CH_3
13	28,80	CH
45	24,25	CH_3
32	21,48	CH_3
33	19,68	CH_3
30	19,05	CH_3
31	17,54	CH_3
29	17,41	CH_3

kan proton-proton yang telah diidentifikasi dengan karbon (karbon mana proton dilekatkan langsung) (Gambar 7). Dugaan identitas senyawa aktif sebagai polipeptida semakin menguat dengan perbandingan data dari pustaka. Perbandingan ini mengarah pada jaspamide (Crews *et al.*, 1986; Zabrieskie *et al.*, 1986 dan Zampella A, *et al.*, 1999). Data ^{13}C -NMR jaspamide (Tabel II) sangat mirip dengan data ^{13}C -NMR senyawa aktif. Perbedaan kecil pada pergeseran kimiawi dapat disebabkan karena resolusi alat yang digunakan berbeda

(Tabel II) yang terlihat adanya pergeseran kimia yang sama antara keduanya, sehingga mendukung perkiraan bahwa senyawa aktif merupakan jaspamide (Gambar 8).

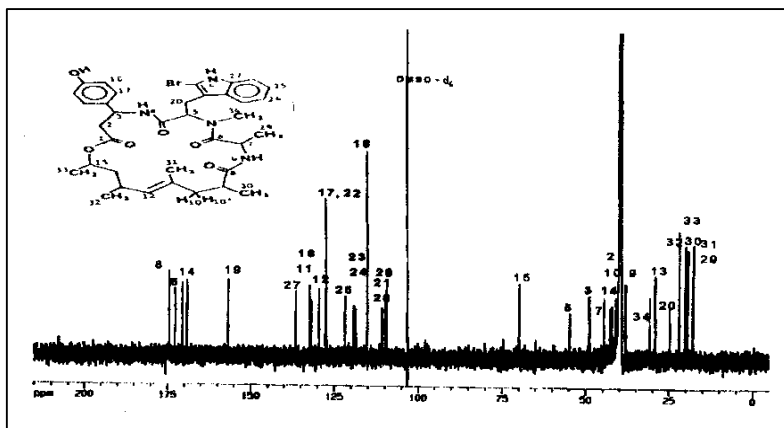
Jumlah karbon yang seharusnya 36 dari jaspamide hanya kelihatan 34 karena 2 karbon yang terdapat pada cincin benzen β -tirosin yang berseberangan dengan karbon 16 dan 17 mempunyai lingkungan elektronik yang sama, sehingga muncul pada δ yang sama pada C-16 dan 17. Tetapi metil C-34 muncul pada daerah *downfield* karena adanya pengaruh atom nitrogen dan oksigen yang bersifat penarik elektron sehingga C-34 menjadi lebih tidak terlindungi. Atom-atom karbon cincin aromatis tirosin terlihat pada C16, 17, 18, 19 sedangkan cincin aromatis triptofan pada C22, 23, 24, 25, 26 dan 27. Karbon 19 muncul pada daerah *downfield* karena mengikat atom oksigen. Untuk kebenaran struktur senyawa aktif dilakukan pendataan spektrum ^1H -NMR dan tehnik 2-D yang lain.

Spektrum ^1H -NMR dalam DMSO-d_6

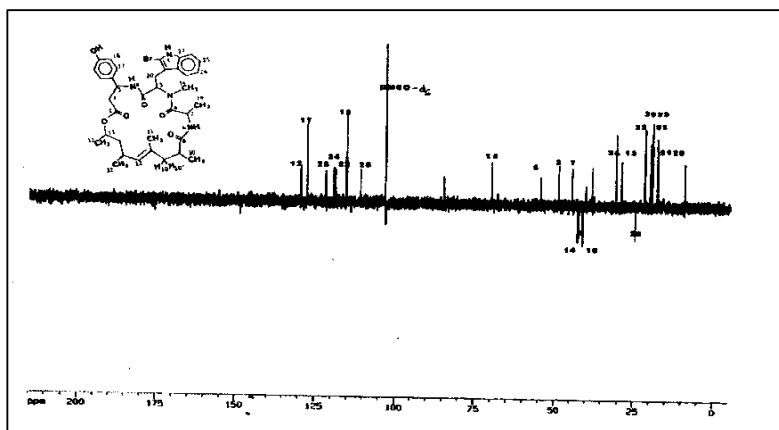
Spektrum ^1H -NMR senyawa aktif menunjukkan jenis dan jumlah proton yang terdapat pada senyawa aktif. Aromatik proton terlihat pada rentang δ 6-8 ppm, proton-proton metil nampak pada daerah 3 ppm ke bawah, sedangkan proton metilen terlihat pada rentang δ 4-6 ppm.

Data ^1H -NMR senyawa aktif yang disusun berdasarkan data spektrum ^1H -NMR (Gambar 10) dan data NMR dua dimensi yaitu HMQC, HMBC=*Heteronuclear Multiple Bond Connectivity* (Gambar 8) dan COSY=*Correlated Spectroscopy* (Gambar 9) tidak nampak adanya perbedaan dengan data jaspamide dari pustaka (Crews *et al.*, 1986; Zabrieskie *et al.*, 1986 dan Zampella A, *et al.*, 1999) sehingga senyawa aktif diidentifikasi sebagai jaspamide (Tabel III). Puncak $-\text{CH}_3$ pada C34 terletak pada daerah yang lebih *downfield* karena berikatan dengan atom nitrogen (δ , 2,95 ppm)

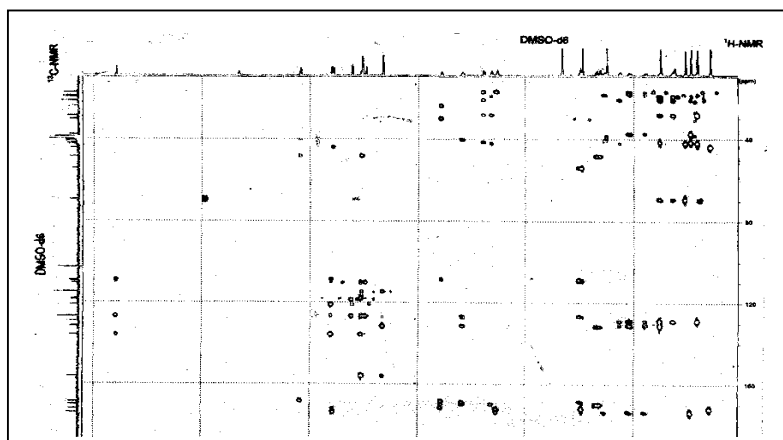
Struktur senyawa yang diberikan oleh Crews *et al.* (1986) terlihat pada Gambar 11. Dari struktur tersebut, terlihat adanya 3 asam amino yaitu asam amino triptofan yang tersubstitusi oleh metil dan brom, β -tirosin dan alanin yang berikatan dengan suatu senyawa alifatik.



Gambar 5. Spektrum ^{13}C -NMR (125 MHz) senyawa aktif dalam DMSO-d_6



Gambar 6. Spektrum ^{13}C -NMR (DEPT) (125 MHz) senyawa aktif dalam DMSO-d_6



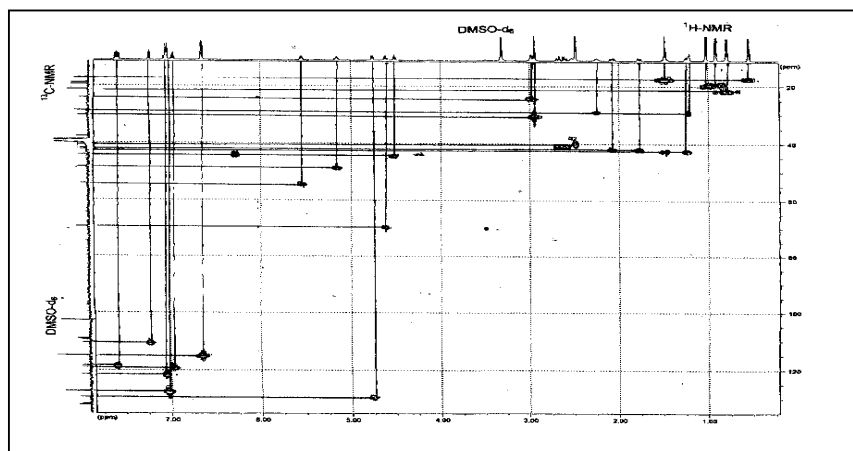
Gambar 7. Spektrum HMQC senyawa aktif

Tabel II. Perbandingan pergeseran kimia ^{13}C -NMR dari senyawa aktif (^{13}C -NMR 125 MHz) dan pustaka (^{13}C -NMR 75 MHz) dalam DMSO-d_6

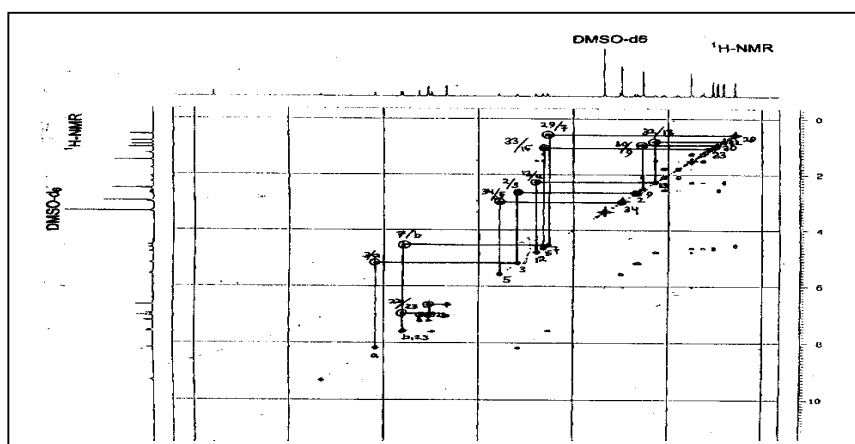
No. C	Senyawa Aktif 125 MHz (pustaka)	Jaspamide 75 MHz (pustaka)
1	170.03	170.1
2	40.70, t	40.8, t
3	48.53, d	48.7, d
4	168.63, s	168.7, s
5	54.32, d	54.5, d
6	172.19, s	172.3, s
7	44.28, d	44.5, d
8	173.99, s	174.2, s
9	37.84, d	37.9, d
10	41.92, t	42.0, t
11	131.95, s	132.0, s
12	129.19, d	129.3, d
13	28.80, d	28.9, d
14	42.42, t	42.5, t
15	69.54, d	69.7, d
16	131.58, s	131.7, s
17	127.22, d	127.3, d
18	114.92, d	115.0, d
19	156.24, s	156.3, s
20	24.25, t	24.3, t
21	109.49, s	109.6, s
22	127.04, s	127.1, s
23	118.32, d	118.4, d
24	118.89, d	119.0, d
25	121.35, d	121.5, d
26	110.47, s	110.6, s
27	136.07, s	136.2, s
28	109.12, s	109.2, s
29	17.41, q	17.5, q
30	21.48, q	21.6, q
31	17.54, q	17.6, q
32	19.05, q	19.2, q
33	19.68, q	19.7, q
34	30.46, d	30.6, q
35	-	-
36	-	-
37	-	-
38	-	-

Tabel III. Perbandingan pergeseran kimia proton NMR dari senyawa aktif (^1H -NMR 500 MHz) dan pustaka (^1H -NMR 300 MHz) dalam DMSO-d_6

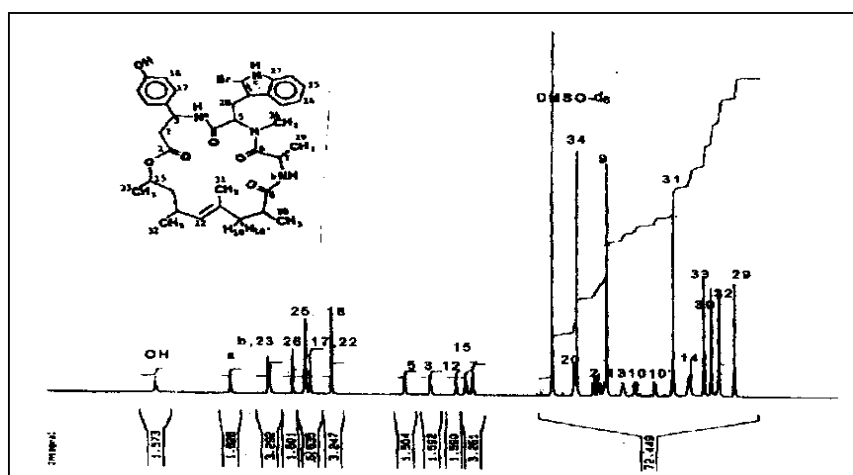
No.H	Senyawa aktif 500 MHZ	Jaspamide 300 MHZ (pustaka)
01.	-	-
02.	2.69, dd=4.41 2.60, dd=9.15	2.90, ABX 2.85, $J_{AB}=15.0$
03.	5.15, sextet=4.41	5.39, dt=8.1, 8.1, 4.5
04.	-	-
05.	5.54, t=6.62	5.79, t=6.8
06.	-	-
07.	4.52, quintet=6.94	4.75, pt=7.1
08.	-	-
09.	2.53, m	2.77, bm
10.	2.07, m= 15.44 1.77, dd=15.44	3.00, brd=15.3 2.00, dd=15.3, 9.6
11.	-	-
12.	4.76, d=8.51	4.99, d=9.0
13.	2.25, q=7.57	2.49, bsm
14.	1.5, m, 1.25, m	1.73, m, 1.48, dt=13.2, 6.6, 6.6
15.	4.61, extet=6.49	4.85, sx=6.3
16.	-	-
17.	7.06, d=8.51	7.26, d=8.5
18.	6.65, d=8.51	6.88, d=8.5
19.	-	-
20.	2.98, m	3.20, m
21.	-	-
22.	-	-
23.	7.6 d= 7.88	7.84, d=8.4
24.	6.96, t= 7.57	7.19, t=7
25.	7.04, t= 6.93	7.28, t=7
26.	7.22 d = 7.88	7.45, d=8.1
27.	-	-
28.	-	-
29.	0.55	0.79, d=6.6
30.	0.92, d=6.62	1.15, d=6.3
31.	1.49, s	1.73, s
32.	0.79	1.03, d=6.3
33.	1.03, d=6.3	1.26, d=6.3
34.	2.95, s	3.18, s
a.	8.17, d=8.83	8.41, d=8.5
b.	7.56, d=15.45	7.80, d=9.0
c.	11.5, s	11.5, bs
OH	9.2, s	9.2, bs



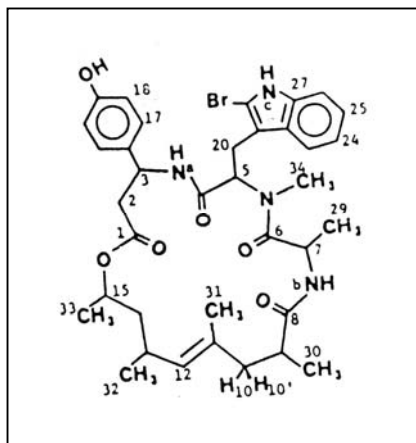
Gambar 8. Spektrum HMBC senyawa aktif



Gambar 9. Spektrum COSY senyawa aktif



Gambar 10. Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa aktif dalam DMSO-d_6



Gambar 11: Struktur Jasplakinolide / Jaspamide menurut Crews *et al.*

Rumus molekul : $C_{35}H_{45}N_4O_6Br$
 $M = 707.9, M+2 = 709.7$

Struktur ini pernah ditemukan oleh Zabrieskie *et al* (1986) dan Crews *et al* (1986) dari jenis spons *Jaspis sp*, tetapi sejauh pengetahuan penulis senyawa ini pertama kali ditemukan dalam spons *Stylissa flabelliformis*.

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kandungan senyawa aktif sitotoksik dan fungisid dari spons *Stylissa flabelliformis* adalah jaspamide.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof.Dr. Peter Proksch, Universitas Duesseldorf, Jerman yang telah banyak membantu penelitian ini. Tim selam UGM Susilo Hadi, Juswono, Yosi Bayu Murti, dan Michael Assman.

Daftar Pustaka

- Crews, P., Manes., I.V and Bohler, M., 1986, Jasplakinolide, a Cyclodepsipeptide from The Marine Sponges *Jaspis sp*, *Tetrahedron Lett.* 27(25) : 2797-2800
- Hooper, J.N.A., 1997, *Sponge Guide: Guide to Sponge Collection and Identification*, pp : 33-38, version March, Queensland Museum, Brisbane.
- Hooper, J.N.A and van Soest, R.W.M., 2002, *Systema Porifera : A Guide to Classification of Sponges*, pp : 783-784, volume 1, Kluwer Academic, Plenum Publisher, New York.
- Setyowati, E.P., Sudarsono and Wahyuono, S., 2003, Penentuan Fraksi Aktif Spons *Stylissa flabelliformis* yang toksik terhadap *Artemia salina* Leach, *J.Teknosains*, Seri A, IPA Jilid 16, nomor 3, hal 499-513, Pascasarjana UGM, Yogyakarta
- Setyowati, E.P., Sudarsono and Wahyuono, S., 2004, Uji Sitotoksik dan Uji Antimikroba Senyawa Bioaktif Spons *Stylissa flabelliformis*, *MFI*, Vol. 15 No. 2, Fak. Farmasi UGM, Yogyakarta
- Silverstein, R.M., Basler, G.C., and Morrill, T.C., 1991, 5th, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Zabrieskie, T.M., Klocke, J.A., Ireland, C.M., Marcus, A.H., Molinski, T.F., Faulkner, J.D., Xu, C., and Clardy, J.C., 1986, Jaspamide a modified peptide from *Jaspis sp* sponge with insectisidal and antifungal activity, *J.Am. Chem. Soc.* 108: 3123-3124
- Zampella, A., Glannini, C., Debitus, C., Rousakis, C., and Auria, M.V.D., 1999, New Jasplakinolide Derivatives from the Marine Sponges *Jaspis splendans* Collected in Vanuatu, *J. Nat. Prod.* 62: 332-334